

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 2 月 27 日 (27.02.2003)

PCT

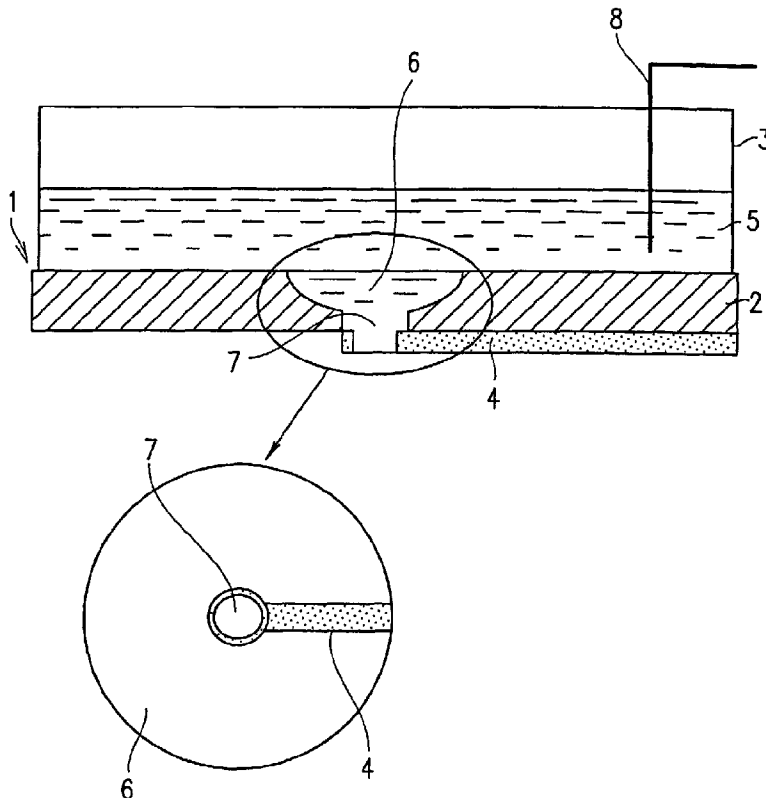
(10) 国際公開番号  
WO 03/016555 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12Q 1/02, G01N 33/483, 33/48, 27/00, 27/26, 27/30, C12M 1/34 (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 松下電器産業株式会社 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒571-8501 大阪府 門真市 大字門真1006番地 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/07984
- (22) 国際出願日: 2002 年 8 月 5 日 (05.08.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岡 弘章 (OKA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒573-1194 大阪府 枚方市 中宮北町 3-10 枚方ガーデンヒルズ 913 号室 Osaka (JP).
- (26) 国際公開の言語: 日本語 小川 竜太 (OGAWA, Ryuta) [JP/JP]; 〒574-0031 大阪府 守口市 橋波東之町 1-4-15 パレラガール 603 Osaka (JP).
- (30) 優先権データ:  
特願2001-242861 2001 年 8 月 9 日 (09.08.2001) JP

[続葉有]

(54) Title: CELL DIAGNOSING METHOD, AND DEVICE AND APPARATUS USED FOR IT

(54) 発明の名称: 細胞診断方法、ならびにそれに用いるデバイスおよび装置



(57) Abstract: A cell diagnosing method comprising the step of providing a reaction system that measures the physico-chemical characteristics of cells, the step of disposing cells or their cell membrane fractions in the reaction system as samples, the step of giving a stimulus to the samples, the step of obtaining the index values of the physico-chemical characteristics of the samples, and the step of diagnosing the conditions of the cells based on the index values. The reaction system comprises a device provided with a substrate to dispose the samples thereon, a reference electrode and a measurement electrode, the disposition environment or characteristics of the reference electrode differing from those of the measurement electrode, the substrate being

[続葉有]



(74) 代理人: 山本 秀策, 外(YAMAMOTO, Shusaku et al.);  
〒540-6015 大阪府 大阪市 中央区 城見一丁目2番27号  
クリスタルタワー15階 Osaka (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(81) 指定国 (国内): CN, JP, KR, US.

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,  
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, SE, SK, TR).

---

provided with a through hole to dispose the samples therein, the reference electrode and the measurement electrode being disposed near the through hole with the samples interposed between them.

(57) 要約:

細胞を診断する方法であって、細胞の物理化学的特性を測定する反応系を提供する工程、細胞またはその細胞膜面分を試料として上記反応系に配置する工程、上記試料に刺激を与える工程、上記試料の物理化学的特性の指標値を得る工程、および上記指標値に基づいて上記細胞の状態を診断する工程を包含する。上記反応系は、上記試料を配置するための基板、基準電極および測定電極を備えるデバイスを備え、上記基準電極の配置環境または特性と、上記測定電極の配置環境または特性とは異なり、上記基板は、上記試料を配置するための貫通孔を備え、上記基準電極および測定電極は、該試料をそれらの間に挟むように上記貫通孔の近傍に配置される。

## 明細書

## 細胞診断方法、ならびにそれに用いるデバイスおよび装置

## 技術分野

- 5       本発明は、診断対象である細胞の状態を判断する細胞診断方法、ならびにそれに用いるデバイスおよび装置に関する。

## 背景技術

- 10       従来、バイオプシサンプルや体液を用いた病理診断では、様々な抗体を用いた染色法により病理診断が行われている。

しかし、これらの方法は、病理医の経験により診断結果が異なったり、抗体力価によって診断誤差が生じる可能性があり、しかもかなりの時間を要するという問題点がある。

- 15       発明の開示

本発明は、上記従来の問題点に鑑み、細胞の変異にともなう細胞の物理化学的特性の変化を測定することにより、診断誤差が少なく、大量のサンプルを容易に短時間で処理することが可能な細胞診断方法、ならびにそれに用いるデバイスおよび装置を提供する。

- 20       本発明は、細胞の状態および特徴を診断する方法に関し、この方法は、細胞の物理化学的特性を測定する反応系を提供する工程、細胞の細胞膜画分を含む試料を該反応系に配置する工程、該試料に刺激を与える工程、該試料の物理化学的特性の指標値を得る工程、および該指標値に基づいて該細胞の状態を診断する工程を包含する。

- 25       前記診断する工程は、前記指標値を、対照試料の物理化学的特性の指標値と比較することを包含し得る。

代表的には、前記刺激は、化学物質、タンパク質、アミノ酸、電圧パルス、電流パルス、電磁波またはレーザー光からなる群から選択され得る。

本発明はまた、前記反応系に用いられるデバイスに関し、このデバイスは、前記試料を配置するための基板、基準電極および測定電極を備え、該基準電極の配置環境または特性と、該測定電極の配置環境または特性とが異なっている。

代表的には、前記基板は、前記試料を配置するための貫通孔を備え、前記基準電極および測定電極は、該試料をそれらの間に挟むように該貫通孔の近傍に配置される。

代表的には、前記基準電極の配置環境または特性、および前記測定電極の配置環境または特性は、該基準電極および測定電極がそれぞれ配置される領域の容積であって、該測定電極が配置される領域の容積は、該基準電極が配置される領域の容積より小さい。

代表的には、前記方法において、前記反応系を提供する工程は、前記デバイスに、該デバイスの基準電極および測定電極が浸漬するに十分な量の電解液を供給することを包含し、そして前記配置する工程は、前記試料を該デバイスの貫通孔の上に位置させることを包含し、ここで、該基準電極を浸漬する電解液の量は、該測定電極を浸漬する電解液の量より多い。

代表的には、前記デバイスは、前記基板の上に配置される細胞培養部、および前記基板の下に配置される細胞吸引部をさらに備え、該細胞培養部は隔壁部材と前記基板とから形成される。

代表的には、前記基準電極は、前記隔壁部材の内壁に配置される。

代表的には、前記指標値を得る工程は、（a）前記試料が発した物理化学的信号を時系列信号値として記録すること、（b）記録された時系列信号値をサンプリングし、複数の値からなる複数の抽出データの群を取得し、該複数の群の各々の標準偏差値を計算すること、（c）該各々の標準偏差値の平均値を計算すること、および（d）該平均値を前記指標値とすることを包含する。

代表的には、前記指標値を得る工程は、（a）前記試料が発した物理化学的信号を時系列信号値として記録すること、（b）記録された時系列信号値をサンプリングし、複数の値からなる抽出データの複数の群を取得し、該複数の群の各々の標準偏差値を計算すること、（c）該各々の標準偏差値を、所定の大きさの標準偏差値を単位とする複数の階級に分類し、該試料の物理化学的特性を示す分布を得ること、（d）該分布を正規分布に近似させること、および（e）得られた正規分布の平均値および半値幅を計算し、前記指標値とすることを包含する。

前記方法は、前記（b）から（e）を複数回繰り返すことをさらに包含し得、各繰り返しにおいてサンプリングする時系列信号値の数を変化させ、得られる複数の前記正規分布の平均値および半値幅から前記指標値を選択する。

前記方法において、前記反応系は複数であり得、前記（b）の前に、前記反応系の各々に配置された複数の試料が発する時系列信号値を加算することをさらに包含し得る。

前記方法は、前記（a）の前に、前記複数の反応系に配置された試料に刺激を同時に与えることをさらに包含し得る。

前記指標値を得る工程は、（a）前記試料が発した物理化学的信号を時系列信号値として記録すること、（b）記録された時系列信号値をサンプリングし、複数の値からなる抽出データの複数の群を取得し、該複数の群の各々の標準偏差を計算すること、（c）該各々の標準偏差を、所定の大きさの標準偏差値を単位とする複数の階級に分類し、該試料の物理化学的特性を示す分布を得ること、（d）該分布を、指数減少、指数増加、ガウス、ローレンツ、シグマ、多重ピークおよび非線形からなる群より選択される曲線近似解析により近似すること、および（e）該（d）により得られた近似曲線の頂点の前後における傾きから該試料の物理化学的特性の指標値を得ることを包含し得る。

前記（b）におけるサンプリングは、前記時系列信号値の1つであるaから時系列的に複数回、次いで前記aから一定時間後の前記時系列信号値bから時系列

的に複数回それぞれ行われ得る。

前記指標値を得る工程は、（a）前記試料が発した物理化学的信号を時系列信号値として記録すること、（b）記録された時系列信号値をサンプリングし、複数の値からなる抽出データの複数の群を取得し、該複数の群の各々の標準偏差を計算すること、（c）得られた標準偏差をサンプリングし、複数の値からなる抽出標準偏差の複数の群を取得し、該抽出標準偏差の複数の群の各々の平均値を計算すること、（d）該平均値が、あらかじめ設定された閾値に到達するときの時系列信号値が発生する時刻に基づいて、該試料の物理化学的特性の指標値を得ることを包含し得る。

10 代表的には、前記方法において、前記（a）は、試料に対する作用が既知の標準化学物質の存在下および被験体化学物質の存在下で行われ、該標準化学物質および該被験体化学物質の濃度を変えて（b）から（e）が繰り返され、そして前記診断する工程は、該標準化学物質の存在下および該被験体化学物質の存在下で得られた指標値を比較することをさらに包含し得る。

15 本発明はまた、前記の細胞診断用デバイスを含む反応系、および試料の物理化学的特性を検出する手段を備える細胞診断装置に関する。

本発明はまた、細胞診断解析用チップに関し、このチップは、細胞の細胞膜面分を含む試料を配置するための基板、基準電極および測定電極を備え、該基板は、  
a. 組織破碎部、b. 細胞培養部、c. センサ部、d. 刺激印加部、e. 信号増  
20 幅部、f. 信号処理部、g. データ表示部、h. コントロールパネル部を有し、  
それによって、該試料の状態を表示し得る。

前記 a. 組織破碎部は、直径 1 ～ 100 ミクロンのマイクロふるいを備え得る。

前記 b. 細胞培養部は、温度制御手段を有し得る。

前記 b. 細胞培養部は、前記湿度制御手段をさらに有し得る。

25 前記温度制御手段は、ペルチェ素子または IH ヒーターを有し得る。

### 図面の簡単な説明

図1は、本発明の一実施の形態における細胞診断用デバイスを示す概略図である。図1における参照番号はそれぞれ以下の部材を示す。1：細胞診断用デバイス、2：SOI基板、3：ウェル、4：測定電極、5：培養液、6：窪み、7：貫通孔、8：基準電極。

図2は、本発明の他の実施の形態における細胞診断用デバイスを示す概略図である。図2における参照番号はそれぞれ以下の部材を示す。10：細胞診断用デバイス、4：測定電極、5：培養液、6：窪み、7：貫通孔、12：Si層、13：SiO<sub>2</sub>層、14：支持基板、19：試料。

図3は、本発明のさらに他の実施の形態における細胞診断用デバイスを示す概略図である。図3における参照番号はそれぞれ以下の部材を示す。5：培養液、13：SiO<sub>2</sub>層、31：空間部、35：吸引ラインアタッチメント、37：細胞吸引系ライン。

図4は、本発明の一実施の形態における細胞診断装置の構成を示す概略図である。図4における参照番号はそれぞれ以下の部材を示す。101：信号源、102：単位標準偏差計算部、103：正規分布近似部、104：刺激発生部、105：平均値計算部、106：平均値・半値幅計算部、107：信号加算部、108：特性計算部、109：特性分類部、110：データ表示部。

図5は、本発明の他の実施の形態における細胞診断装置の構成を示す概略図である。図5における参照番号は、図4における参照番号と同じ部材を示す。

図6は、本発明のさらに他の実施の形態における細胞診断装置の構成を示す概略図である。図6における参照番号はそれぞれ以下の部材を示す。101：信号源、102：単位標準偏差計算部、103：正規分布近似部、106：平均値・半値幅計算部、109：特性分類部、110：データ表示部、111：サンプル数振り分け部。

図7は、本発明のさらに他の実施の形態における細胞診断装置の構成を示す概

略図である。図 7 における参照番号はそれぞれ以下の部材を示す。101：信号源、102：単位標準偏差計算部、103：正規分布近似部、104：刺激発生部、106：平均値・半値幅計算部、109：特性分類部、110：データ表示部。

5 図 8 は、本発明の一実施の形態における細胞診断装置を用いて測定した、ラットの胃底部より調製した正常細胞およびがん細胞を含む細胞の、Carbachol に対する反応の濃度依存性を示す図である。

図 9 は、本発明の他の実施の形態における細胞診断装置を用いて測定した、ラットの胃底部より調製した正常細胞およびがん細胞を含む細胞の、Carbachol 投与前後の測定結果を示す図である。

図 10 は、本発明の一実施の形態における細胞診断装置を用いて測定した、ラット正常胃底部およびラット発癌胃底部より調製した細胞の、200 Hz のパルス電圧に対する反応を示す図である。

図 11 は、本発明の一実施の形態における細胞診断装置を用いて測定した、ラット胃底部より調製した正常細胞由来膜分画およびがん細胞由来膜分画の、200 Hz のパルス電圧に対する反応を示す図である。

図 12 は、本発明の一実施の形態である、細胞診断解析用チップの概略を示す図である。この細胞診断解析用チップは、上記細胞診断用デバイスの基板上に、a. 組織破碎部、b. 細胞培養部、c. センサ部、d. 刺激印加部、e. 信号増幅部、f. データ処理部、g. データ表示部、および h. コントロールパネル部を有し、それによって、該試料の状態を表示することができる。図 12 における参照番号はそれぞれ以下の部材を示す。201：サンプル注入口、202：細胞破碎部、203：細胞培養部およびセンサ部、204：刺激印加部、205：信号増幅部、206：信号処理部、207：データ表示部、208：コントロールパネル部。



発明を実施するための最良の形態

本発明の細胞を診断する方法は、細胞の物理化学的特性を測定する反応系を提供する工程、細胞またはその細胞膜画分を試料として上記反応系に配置する工程、上記試料に刺激を与える工程、上記試料の物理化学的特性の指標値を得る工程、  
5 および上記指標値に基づいて該細胞の状態を診断または特徴付ける工程を包含する。

上記反応系に配置される細胞は、組織標本の形態であってもよいし、単離されたフリーの細胞の状態であってもよいし、固定された状態のものであってもよい。

上記刺激として、電圧パルス、電流パルス、電磁波、レーザー光のような物理的  
10 刺激、薬剤との接触のような化学的刺激などを用いることができる。

また本発明のデバイスは、上記細胞を診断する方法における反応系で用いられるデバイスであって、試料となる細胞またはその細胞膜分画を試料として配置するための基板、基準電極および測定電極を備え、上記基準電極の配置環境または特性と、上記測定電極の配置環境または特性とが異なることを特徴とする。

15 ここで、上記基板は、上記試料を配置するための貫通孔を備え、上記基準電極および測定電極は、上記試料をそれらの間に挟むように上記貫通孔の近傍に配置される。

基板の材質としては、半導体、絶縁体、無機材料、および有機材料のいずれをも用いることができる。基板の材質の例として、例えば、シリコン、シリコン酸  
20 化物、シリコン・オン・インシュレータ（以下、SOIと略称する）、プラスチック、ゴム、高分子フィルムなどが挙げられ、中でもSOI、高分子フィルムが好適に用いられ、多孔性高分子フィルムがさらに好適に用いられる。基板の厚さは、 $1 \sim 10000 \mu\text{m}$ であることが好ましく、 $10 \sim 100 \mu\text{m}$ であることがさらに好ましい。貫通孔の直径は、 $1 \sim 100 \mu\text{m}$ であることが好ましく、 $5 \sim$   
25  $10 \mu\text{m}$ であることがさらに好ましい。

また、上記配置環境または特性の1つの例は、基準電極および測定電極がそれ

ぞれ配置される領域の容積であって、上記測定電極が配置される領域の容積は、上記基準電極が配置される領域の容積より小さいことが好ましい。ここで、好ましくは、基準電極が配置される領域の容積は、測定電極が配置される領域の容積の5倍以上であり、より好ましくは10倍以上である。

- 5       上記のデバイスは、通常、上記基板の上に配置される細胞培養部、および上記基板の下に配置される細胞吸引部をさらに備え、上記細胞培養部は、隔壁部材と前記基板とから形成され得る。ここで、隔壁部材の形状は特に限定されないが、円筒状であることが好ましい。隔壁部材の材質としては、シリコン、シリコン酸化物、プラスチック、ゴムなどが好適に用いられる。本明細書で用いる用語「センサ部」は、特に、上記細胞培養部および細胞吸引部を除いた上記デバイスについて言及する場合に用いられる。
- 10

図1および2を用いて本発明を説明する。図1は、本発明の方法において反応系として用いるデバイスの一例の概略を示す断面図である。

- 細胞診断用デバイス1は、SOI基板2を備え、その上面に試料となる細胞または細胞膜分画を収容する細胞培養部であるウェル3、その下面に信号を検出するための代表的には金である測定電極4を配置してある。ウェル3内には、電解液として機能する約50 $\mu$ lの培養液5、そしてSOI基板2に配置される貫通孔7には約1 $\mu$ l以下の培養液が存在する。
- 15

- ここで、ウェル3は、培養液を保持するための隔壁部材（図示せず）とSOI基板2とが組み合わさることによって形成される。上記ウェル3内にあってSOI基板に形成される窪み6は、細胞または細胞膜分画を保持するのに最適な形状に形成され、代表的には、その開口部の直径が約10 $\mu$ mであって、半楕円形である。上記ウェル3内には、基準電極8（代表的にはAg-AgCl）が培養液5に浸漬されるように配置してある。
- 20

- ここで本明細書では、基準電極8を収容するウェル3、これを浸漬する培養液5、および窪み6を総称して基準電極配置環境、そして測定電極4近傍にある、
- 25

貫通孔 7 およびそこに含まれる培養液を総称して測定電極配置環境と定義する。

窪み 6 のサイズは、試料に依存して変化し得、試料が保持される大きさであれば特に制限されないが、代表的には、窪み 6 の開口部の直径は  $10 \sim 500 \mu\text{m}$  の範囲、深さは  $1 \sim 500 \mu\text{m}$  の範囲にある。通常窪み 6 の開口部の直径は  $10 \sim 100 \mu\text{m}$  の範囲、深さは  $2 \sim 100 \mu\text{m}$  の範囲にある。好適な窪みとして、例えば、開口部の直径が  $20 \mu\text{m}$  および深さが  $10 \mu\text{m}$  の窪み、開口部の直径が  $20 \mu\text{m}$  および深さが  $20 \mu\text{m}$  の窪みが挙げられる。また、貫通孔のサイズもまた、試料が通過せずに、窪みと協働して試料が保持される限り特に制限されないが、代表的には、貫通孔の直径は  $1 \sim 100 \mu\text{m}$  の範囲、深さは  $10 \text{ nm} \sim 100 \mu\text{m}$  の範囲にある。好適な貫通孔として、例えば、直径が  $5 \mu\text{m}$  および深さが  $1.5 \mu\text{m}$  のサイズの貫通孔が挙げられる。

図 1 の下に示されるのは、窪み 6 の拡大平面図である。

図 2 は、本発明の方法における反応系に用いるデバイスの別の一例の概略を示す図である。図 2 に示すデバイス 10 では、図 1 に示すデバイス 1 とは、窪み 6 および貫通孔 7 が複数設置されている点で異なる。そして図 2 では各窪み 6 に図中楕円型で試料 19 が保持されて示されている。基板 12 $\sim$ 14 は SOI で作製され、Si 層 12 の下には  $\text{SiO}_2$  層 13 が配置され、さらに  $\text{SiO}_2$  層 13 の下には支持基板 14 が配置されている。支持基板 14 の表面および  $\text{SiO}_2$  層 13 の表面の一部に沿って、測定電極 4 が、試料 19 に接触するか、試料 19 の近傍、好ましくは、試料 19 との距離が  $10 \mu\text{m}$  以内であるように基板 12 $\sim$ 14 の裏面に配置される。

本発明の方法における反応系に用いるデバイスにおいて、測定電極 4 の近傍の空間には、微量の電解液だけが存在する。具体的には、試料が設置される基板の面と対向する面の近傍、すなわち基板の裏面に存在する電解液は、貫通孔を満たしている電解液に加え、多くとも  $1 \sim 10 \mu\text{l}$  程度である。

図 1 および 2 に示すように、1 つの測定電極あたり、窪み 6 および貫通孔 7 を

1つ備えていてもよいし、1つの測定電極あたり複数の窪み6および貫通孔7を備えていてもよい。

図3は、図2に示すデバイス10を用いて試料である細胞または細胞膜分画の物理化学的特性を測定するとき、必要に応じて用いられる細胞吸引部の概略を示す図である。図3では、基板を構成する $\text{SiO}_2$ 層13の裏面に配置され、細胞吸引部を構成する吸引ラインアタッチメント35および細胞吸引系ライン37が示される。この吸引ラインアタッチメント35は、アクリル、PMDs、シリコンゴムなどの材料から作製され、基板に設けられた複数の貫通孔7に対応する、細胞吸引系ライン37に連絡する空間部31を形成するように成型され、基板の裏面にシリコンゴムなどを媒体として取り付けられる。さらに基板に接着して一体化することも可能である。図3に示されるように、細胞または細胞膜分画の物理化学的特性を測定するときは、好ましくは、細胞吸引系ライン37からの引圧によって試料である細胞または細胞膜分画を基板に密着させる。ここで、測定電極において試料である細胞または細胞膜分画の物理化学的特性を検出し得る限り、特に細胞吸引部全体を電解液で満たす必要はない。なお、図3では、試料である細胞または細胞膜分画は省略し、そして窪みおよび貫通孔の構造は簡略化して示してある。

図4は、本発明のデバイスを備え、診断対象である細胞の状態を判断するための細胞診断装置の構成の概念図である。本装置は、上記デバイスを備えた測定部（信号源）101、測定部101からの信号をサンプリングし、標準偏差の計算を行う単位標準偏差計算部102、得られた標準偏差の平均値を計算する平均値計算部105、および平均値計算部105から出力された標準偏差の平均値から、試料である細胞または細胞膜分画の物理化学的特性を計算する特性計算部108、および得られた物理化学的特性を表示するデータ表示部110を備える。各部の連絡は図4中、点線または実線で示される。なお、代表的には、上記の単位標準偏差計算部102、平均値計算部105、および特性計算部108は、これらの

計算を実行するためのプログラムが記録されたハードディスクを内蔵するコンピュータである。そして上記データ表示部 110 は CRT である。

なお、図 4 中、参照番号 103、104、106、107、109 は、それぞれ以下で説明する、正規分布近似部、刺激発生部、平均値・半値幅計算部、信号加算部、特性分類部である。

図 12 に、本発明の一実施の形態である細胞診断解析用チップの概略を示す。このチップは、細胞またはその細胞膜画分を試料として配置するための基板、基準電極および測定電極を備え、この基板上に、サンプル注入口 201、組織破碎部 202、細胞培養部、センサ部（図 12 では一体化された部材として参照番号 203 で示される）、刺激印加部 204、信号増幅部 205、信号処理部 206、データ表示部 207、およびコントロールパネル部 208 を有し、それによって、細胞を診断するための上記一連の工程を行い、その結果を表示することができる。

サンプル注入口 201 から注入された試料は、細胞破碎部 202 に流体連絡する流路を通して細胞破碎部 202 に導入される。組織破碎部 202 は、代表的には、直径 20 ミクロンのマイクロふるい（例えば、ミリポア社から入手可能）を備え、細胞培養部に配置するための細胞、細胞膜画分などの被検対象試料を回収する。次いで、回収された試料は、細胞培養部に流体連絡する流路を通じて細胞培養部に導入される。細胞培養部は、上記のような本願のデバイスであって基準電極および測定電極を備えたセンサ部の上に配置され、導入された試料は、このセンサ部において、コントロールパネル部 208 の制御下にある刺激印加部 204 からの刺激を受け、試料の物理化学的特性の指標である信号を発生する。

通常、細胞培養部は、試料を活性な状態に維持するため温度制御手段、湿度制御手段を備える。温度制御手段として、ペルチェ素子、IHヒーターなどを用いることができる。発生した信号は、センサ部に連結された信号増幅部 205 で増幅され、そして信号処理部 206 で処理され、データ表示部 207 に送られて得られた処理結果が表示される。なお、上記各部材を構成する要素および各部材間

の連結は、当業者に公知の要素および連結様式を用い得るので、特に説明はしない。また、図示される例では、細胞診断解析チップは、細胞診断の一連の工程を行うための上記の各部材を備えた4つのラインを備えているが、ラインの数は特に制限されるものではない。

5       本発明の方法、デバイスおよび細胞診断装置は、従来の細胞外記録法では検出することが不可能であった信号を抽出する、簡易なデバイスと装置とを提供することによって、細胞診断を行う新規な手法を提供する。

10       本発明の細胞を診断する方法は、抗体を用いないので、抗体を用いる方法では必須の染色工程は不要であり、また抗体力価に起因して診断誤差が生じるといった問題もない。本発明の細胞を診断する方法は、細胞または細胞膜分画の物理化学的特性を測定することにより、診断対象である細胞の変異を検出するため、大量のサンプルを高速に処理することができ、自動化も可能である。

15       本発明の細胞を診断する方法は、細胞または細胞膜分画の物理化学的特性の指標値を得る工程において、代表的には、一定のサンプリング速度で取り込まれたデジタル信号（時系列信号値）を処理するので、ノイズ信号中から、細胞または細胞膜分画の物理化学的特性を有意な信号として抽出、測定および分類することを可能にする。

20       本発明のデバイスおよび細胞診断装置は、専用の制御装置を必要とせず、試料となる細胞または細胞膜分画を基板上に配置するだけで、試料と基板との間に高抵抗のシールド（ギガシールド）を形成することなく、上記試料の細胞外電位を容易に短時間で測定することが可能である。

      本発明のデバイスは、測定電極と基準電極の配置環境を変化させることにより、細胞または細胞膜分画とデバイスとの間に高抵抗のシールド（ギガシールド）を形成しなくても、細胞または細胞膜分画の物理化学的特性を計測し得る。

25

実施例

以下、本発明の具体例について図面を参照しながら説明する。

以下実施例を用いて本発明を説明するが、本発明はこれらのみに限定されるものではない。

(実施例 1)

5 図 3 に示すデバイスを測定部（信号源）101として備えた図 4 に示す構成の細胞診断装置を用い、ラットの胃底部より調製した、正常細胞およびがん細胞をそれぞれ試料として、化学物質 Carbachol のこれら試料に対する作用を測定した。

Carbachol は、神経伝達物質であるアセチルコリンのアナログである  
10 ことが知られる化学物質である。Carbachol（Sigma 社製）を Krebs Ringer 液に溶解し、0、0.1、0.3、1、3、10、30、および 100  $\mu$ M の濃度でラットの胃底部由来の正常細胞およびがん細胞にそれぞれ作用させたときの電氣的信号をそれぞれ測定した。各 Carbachol 濃度について、図 3 に示す細胞診断用デバイスを備えた測定部（信号源）101 から得た 10 秒間の時系列信号値から、100 ミリ秒ごとの時系列データをサンプリングして標準偏差を計算した。得られた標準偏差の平均値をプロットした結果を図 8 に示す。図 8 において、黒丸はがん細胞を含む細胞により得られた結果を、  
15 白丸は正常細胞により得られた結果を表す。

図 8 に示すように、正常細胞、がん細胞ともに、Carbachol 濃度が大きいほど、100 ミリ秒毎の標準偏差値の平均値が大きいことを確認した。これは、Carbachol 濃度に依存して、ラットの胃底部より調製した細胞のイオンチャンネルが活性化されたことを示す。

また、図 8 に示すように、Carbachol 1～30  $\mu$ M 濃度で、がん細胞は、正常細胞と比べ、得られる電氣的信号の標準偏差が大きく、正常細胞とは異なる Carbachol 濃度依存性のパターンを示した。このことから、本発明の方法および細胞診断装置を用いて、細胞の物理化学的特性を測定することにより、  
25

がん細胞の有無を判断することができることが示された。

(実施例 2)

図 5 もまた、本発明の、診断対象である細胞の状態を判断するための細胞診断装置の構成の概念図である。本装置は、図 4 に示す装置の平均値計算部 1 0 5 および特性計算部 1 0 8 の代わりに、正規分布近似部 1 0 3、平均値・半値幅計算部 1 0 6、および特性分類部 1 0 9 を用いる。各部の連絡は図 5 中、点線または実線で示される。

正規分布近似部 1 0 3 は、単位標準偏差計算部 1 0 2 で得られた複数の標準偏差の値を、一定幅の標準偏差を単位とする、複数の階級に分類し、この階級を X 軸とし、各階級に存在する標準偏差の個数を Y 軸とする座標上に計算された標準偏差値をプロットし、得られたグラフを正規分布に近似する。平均値・半値幅計算部 1 0 6 は、得られた正規分布の平均値および半値幅を計算する。物理化学的特性を分類する特性分類部 1 0 9 は、得られた平均値および半値幅から物理化学的特性を分類する。なお、代表的には、図 4 に示される装置と同様に、上記の単位標準偏差計算部 1 0 2、正規分布近似部 1 0 3、平均値・半値幅計算部 1 0 6 および特性分類部 1 0 9 は、これらの計算を実行するためのプログラムが記録されたハードディスクを内蔵するコンピュータである。そして上記データ表示部 1 1 0 は C R T である。

図 3 に示すデバイスを測定部（信号源）として備えた図 5 に示す構成の装置を用い、実施例 1 と同様に、ラットの胃底部より調製した正常細胞およびがん細胞を含む細胞を試料として、化学物質 C a r b a c h o l の試料に対する作用を測定した。

ラットの胃底部より調製した正常細胞およびがん細胞に対し、 $50\mu\text{M}$ 濃度の C a r b a c h o l を投与する前後で、本発明のデバイスを備えた測定部（信号源）1 0 1 から得た信号から、実施例 1 とほぼ同様にして標準偏差を計算した。正規分布近似部 1 0 3 でプロットされた標準偏差のグラフを図 9 に示す。



図9のAは、正常細胞およびがん細胞についてCarbacholを投与する前の10秒間の電気信号の時系列データを5ミリ秒毎に計算して得た標準偏差の値のヒストグラムであり、Bは正常細胞についてCarbachol投与後の10秒間の電気信号の時系列データを5ミリ秒毎に計算して得た標準偏差の値のヒストグラムであり、Cはがん細胞についてCarbachol投与後の10秒間の電気信号の時系列データを5ミリ秒毎に計算して得た標準偏差の値のヒストグラムである。図9に示されるように、Carbachol投与後で、正常細胞およびがん細胞の両方について5ミリ秒毎の標準偏差値の平均値および半値幅が増加していることが確認された。さらに、がん細胞の方が正常細胞よりも標準偏差値の平均値および半値幅が大きいたことが確認された。このことから、本発明の方法および細胞診断装置を用いて、細胞の物理化学的特性を測定することにより、がん細胞の有無を判断することができることが示された。

### (実施例3)

実施例1と同様に、ラット正常胃底部およびラット発癌胃底部より調製した細胞を試料として、これら試料に刺激として200Hzのパルス電圧を印加したときに得られた、試料から発生する電圧信号を測定した。結果を図10に示す。さらに、正常細胞由来膜分画およびがん細胞由来膜分画を試料として同様の実験を行ったときの結果を図11に示す。各図において、実線が正常細胞試料についての測定結果を、そして点線ががん細胞試料についての測定結果をそれぞれ示す。

図10および11に示すように、試料として細胞を用いた場合および細胞膜分画を用いた場合ともに、正常細胞に比べてがん細胞では電圧信号の振幅が減衰することが見出された。このことから、本発明の方法および細胞診断装置を用いて、細胞の物理化学的特性を測定することにより、がん細胞の有無を判断することができることが示された。

本実施例においては、図4に示したような、単位標準偏差計算部を使わず、単

純に電圧信号の減衰のみで比較を行った。しかしながら、パルス印加を様々な周波数で行い、そのときのインピーダンス変化や容量成分解析を行うことによりさらに詳細な解析を行うことが可能である。

5        このように、本発明の方法および細胞診断装置を用いて、従来の免疫染色を行わなくても、簡便に細胞または細胞膜分画の物理化学的特性を測定・抽出し、細胞の状態を判断できることが示された。上記の実施例では、反応系において複数の細胞またはそれから調製された細胞膜分画の物理化学的特性を測定したが、一つの細胞を用いた場合の測定においても同様の結果を得ることが可能である。

10        なお、上記実施例では、図4または図5に概略を示す装置を用いたが、これに代えて、図6または図7に概略を示す構成の装置を用いてもよい。

      図6に示す装置は、図5に示す装置に加えて、参照番号111で示されるサンプル数振り分け部を備える。

15        図7に示す装置は、図5に示す装置において、本発明の細胞診断用デバイスを備えた信号源101を複数備え、さらにこれらの信号源に刺激を与える刺激発生部104、および複数の信号源101からの信号を加算する信号加算部107を備える。

#### 産業上の利用可能性

20        細胞の変異にともなう細胞の物理化学的特性の変化を測定することにより、診断誤差が少なく、大量のサンプルを容易に短時間で処理することが可能な細胞診断方法、ならびにそれに用いるデバイスおよび装置が提供される。

## 請求の範囲

1. 細胞の状態および特徴を診断する方法であって、  
細胞の物理化学的特性を測定する反応系を提供する工程、  
5 細胞の細胞膜画分を含む試料を該反応系に配置する工程、  
該試料に刺激を与える工程、  
該試料の物理化学的特性の指標値を得る工程、および  
該指標値に基づいて該細胞の状態を診断する工程、  
を包含する、方法。
- 10
2. 前記診断する工程が、前記指標値を、対照試料の物理化学的特性の指標値  
と比較することを包含する、請求項 1 に記載の方法。
3. 前記刺激が、化学物質、タンパク質、アミノ酸、電圧パルス、電流パルス、  
15 電磁波またはレーザー光からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。
4. 請求項 1 に記載の反応系に用いられるデバイスであって、  
前記試料を配置するための基板、基準電極および測定電極を備え、該基準電極  
の配置環境または特性と、該測定電極の配置環境または特性とが異なる、デバイ  
20 ス。
5. 前記基板が、前記試料を配置するための貫通孔を備え、前記基準電極およ  
び測定電極が、該試料をそれらの間に挟むように該貫通孔の近傍に配置される、  
請求項 4 に記載のデバイス。
- 25
6. 前記基準電極の配置環境または特性、および前記測定電極の配置環境また

は特性が、該基準電極および測定電極がそれぞれ配置される領域の容積であって、該測定電極が配置される領域の容積が、該基準電極が配置される領域の容積より小さい、請求項 4 に記載のデバイス。

- 5           7. 前記反応系を提供する工程が、請求項 5 に記載のデバイスに、該デバイスの基準電極および測定電極が浸漬するに十分な量の電解液を供給することを包含し、そして

前記配置する工程が、前記試料を該デバイスの貫通孔の上に位置させることを包含し、

- 10           ここで、該基準電極を浸漬する電解液の量が、該測定電極を浸漬する電解液の量より多い、請求項 1 に記載の方法。

8. 前記基板の上に配置される細胞培養部、および前記基板の下に配置される細胞吸引部をさらに備え、該細胞培養部が隔壁部材と前記基板とから形成される、  
15           請求項 5 に記載のデバイス。

9. 前記基準電極が、前記隔壁部材の内壁に配置される、請求項 8 に記載のデバイス。

- 20           10. 前記指標値を得る工程が、  
          (a) 前記試料が発した物理化学的信号を時系列信号値として記録すること、  
          (b) 記録された時系列信号値をサンプリングし、複数の値からなる複数の抽出データの群を取得し、該複数の群の各々の標準偏差値を計算すること、  
          (c) 該各々の標準偏差値の平均値を計算すること、および  
25           (d) 該平均値を前記指標値とすることを包含する、請求項 1 に記載の方法。

1 1. 前記指標値を得る工程が、

(a) 前記試料が発した物理化学的信号を時系列信号値として記録すること、

(b) 記録された時系列信号値をサンプリングし、複数の値からなる抽出データの複数の群を取得し、該複数の群の各々の標準偏差値を計算すること、

5 (c) 該各々の標準偏差値を、所定の大きさの標準偏差値を単位とする複数の階級に分類し、該試料の物理化学的特性を示す分布を得ること、

(d) 該分布を正規分布に近似させること、および

(e) 得られた正規分布の平均値および半値幅を計算し、前記指標値とすることを包含する、請求項 1 に記載の方法。

10

1 2. 前記 (b) から (e) を複数回繰り返すことをさらに包含する請求項 1 1 に記載の方法であって、各繰り返しにおいてサンプリングする時系列信号値の数を変化させ、得られる複数の前記正規分布の平均値および半値幅から前記指標値を選択する、請求項 1 1 に記載の方法。

15

1 3. 前記反応系が複数であって、前記 (b) の前に、前記反応系の各々に配置された複数の試料が発する時系列信号値を加算することをさらに包含する、請求項 1 1 に記載の方法。

20

1 4. 前記 (a) の前に、前記複数の反応系に配置された試料に刺激を同時に与えることをさらに包含する、請求項 1 3 に記載の方法。

1 5. 前記指標値を得る工程が、

(a) 前記試料が発した物理化学的信号を時系列信号値として記録すること、

25 (b) 記録された時系列信号値をサンプリングし、複数の値からなる抽出データの複数の群を取得し、該複数の群の各々の標準偏差を計算すること、

(c) 該各々の標準偏差を、所定の大きさの標準偏差値を単位とする複数の階級に分類し、該試料の物理化学的特性を示す分布を得ること、

(d) 該分布を、指数減少、指数増加、ガウス、ローレンツ、シグマ、多重ピークおよび非線形からなる群より選択される曲線近似解析により近似すること、  
5 および

(e) 該 (d) により得られた近似曲線の頂点の前後における傾きから該試料の物理化学的特性の指標値を得ることを包含する、請求項 1 に記載の方法。

1 6. 前記 (b) におけるサンプリングが、前記時系列信号値の 1 つである a  
10 から時系列的に複数回、次いで前記 a から一定時間後の前記時系列信号値 b から時系列的に複数回それぞれ行われる、請求項 10 に記載の方法。

1 7. 前記指標値を得る工程が、

(a) 前記試料が発した物理化学的信号を時系列信号値として記録すること、  
15 (b) 記録された時系列信号値をサンプリングし、複数の値からなる抽出データの複数の群を取得し、該複数の群の各々の標準偏差を計算すること、

(c) 得られた標準偏差をサンプリングし、複数の値からなる抽出標準偏差の複数の群を取得し、該抽出標準偏差の複数の群の各々の平均値を計算すること、

(d) 該平均値が、あらかじめ設定された閾値に到達するときの時系列信号値  
20 が発生する時刻に基づいて、該試料の物理化学的特性の指標値を得ることを包含する、請求項 1 に記載の方法。

1 8. 前記 (a) が、試料に対する作用が既知の標準化学物質の存在下および被験体化学物質の存在下で行われ、該標準化学物質および該被験体化学物質の濃  
25 度を変えて (b) から (e) が繰り返され、そして

前記診断する工程が、該標準化学物質の存在下および該被験体化学物質の存在

下で得られた指標値を比較することをさらに包含する、請求項 11 に記載の方法。

19. 請求項 8 に記載の細胞診断用デバイスを含む反応系、および試料の物理化学的特性を検出する手段を備える、細胞診断装置。

5

20. 細胞診断解析用チップであって、

細胞の細胞膜画分を含む試料を配置するための基板、基準電極および測定電極を備え、

10 該基板が、a. 組織破碎部、b. 細胞培養部、c. センサ部、d. 刺激印加部、  
e. 信号増幅部、f. 信号処理部、g. データ表示部、h. コントロールパネル  
部を有し、それによって、該試料の状態を表示し得る、チップ。

21. 前記 a. 組織破碎部が、直径 1 ～ 100 ミクロンのマイクロふるいを備える、請求項 20 に記載の細胞診断用チップ。

15

22. 前記 b. 細胞培養部が、温度制御手段を有する、請求項 20 に記載の細胞診断用チップ。

20 23. 前記 b. 細胞培養部が、前記湿度制御手段をさらに有する、請求項 22  
に記載の細胞診断用チップ。

24. 前記温度制御手段が、ペルチェ素子または IH ヒーターを有する、請求項 22 に記載の細胞診断用チップ。

図 1

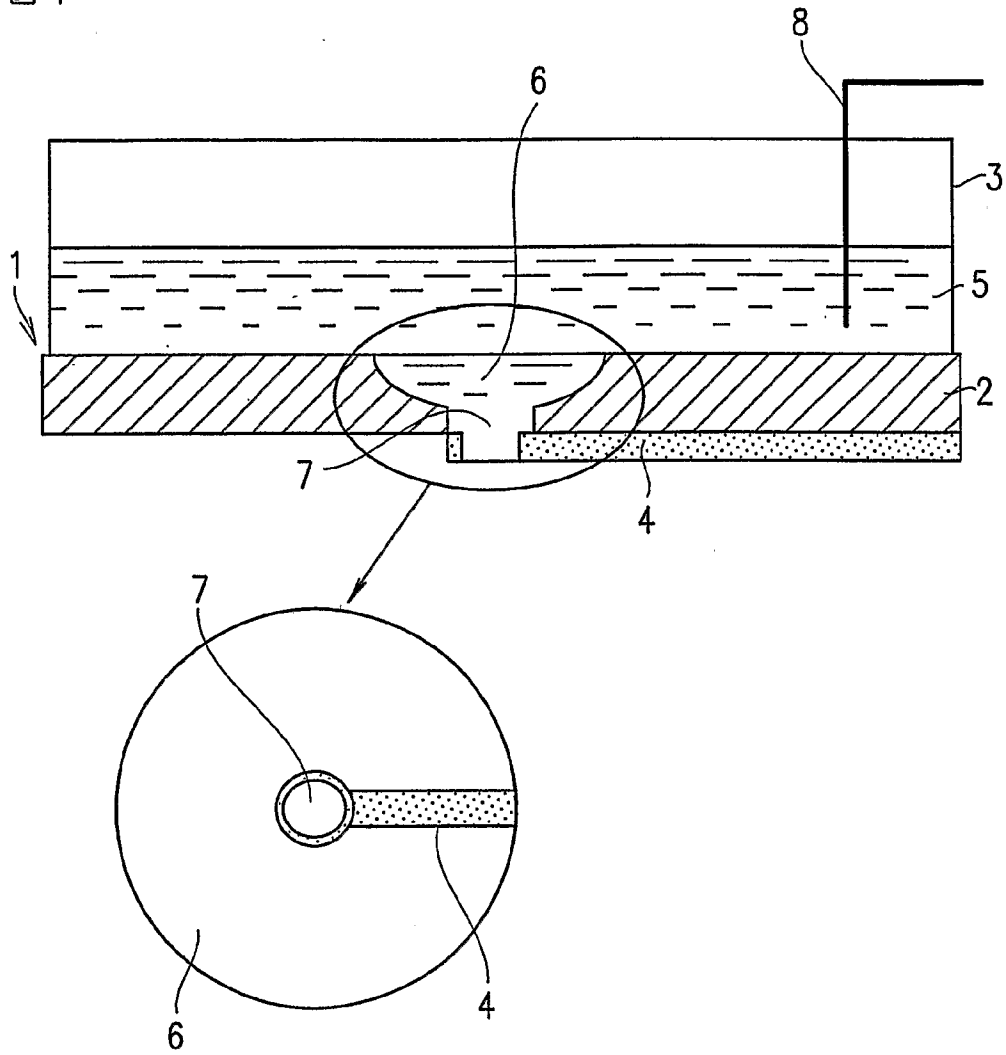
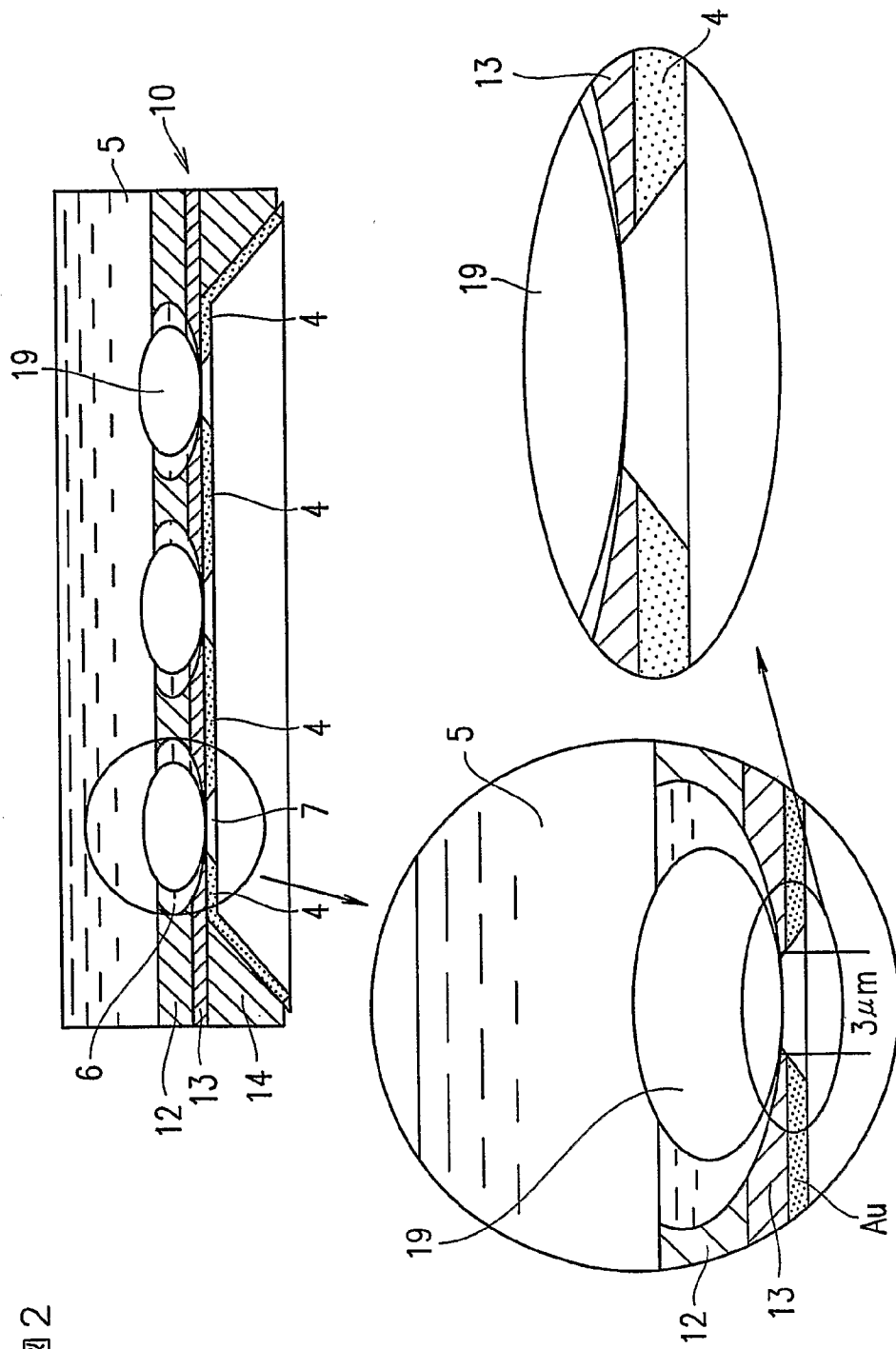




图 2



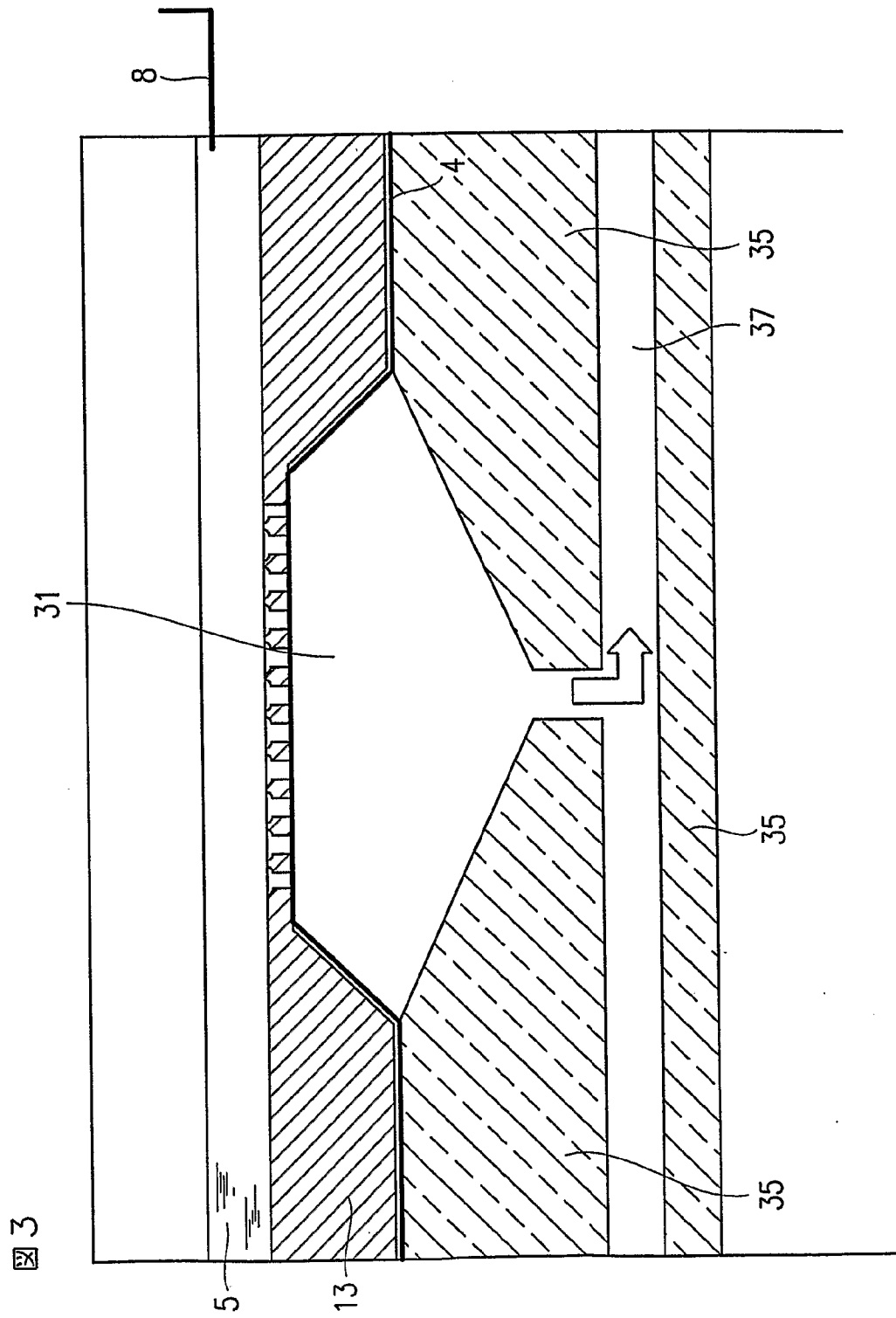
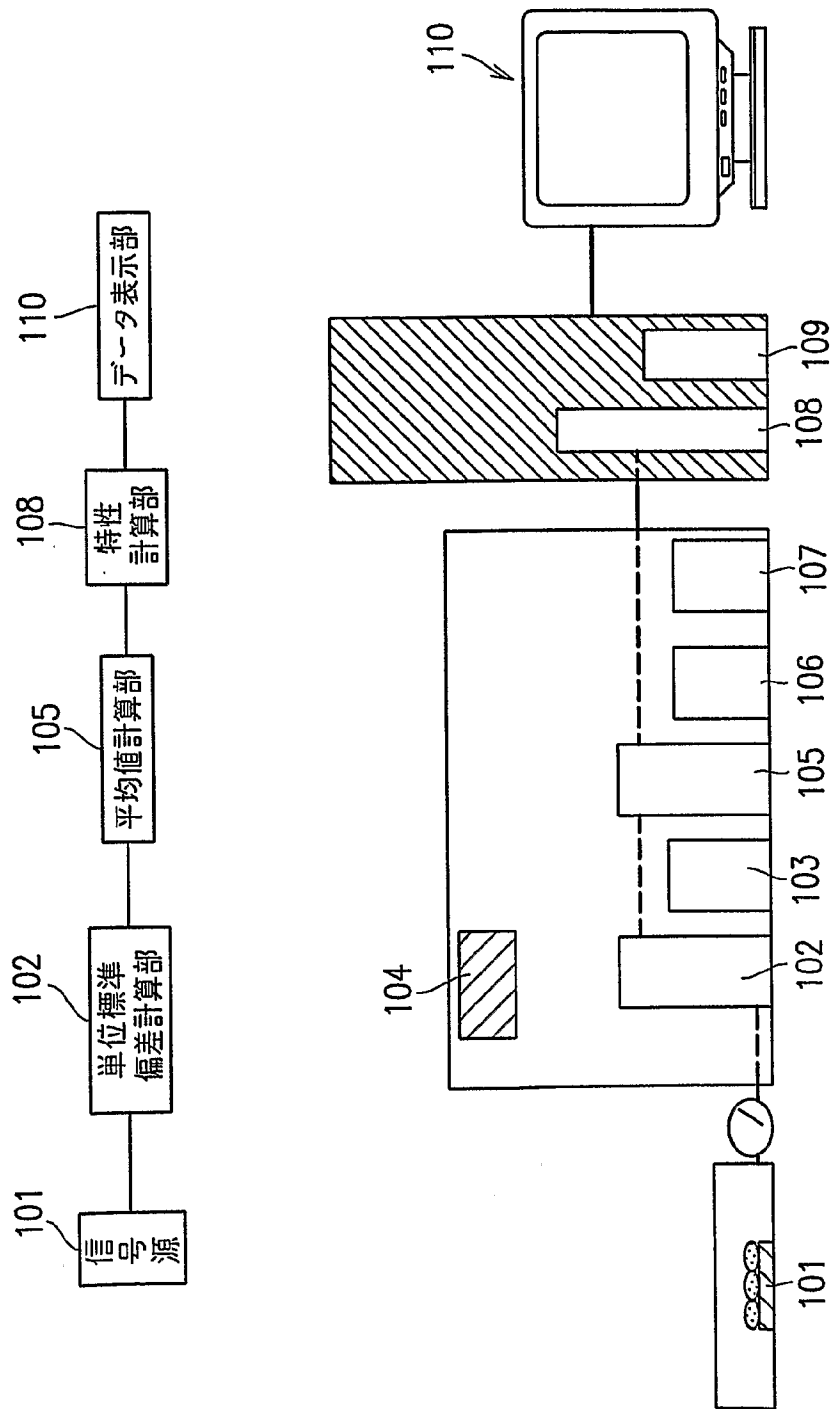


図 4



5  
X

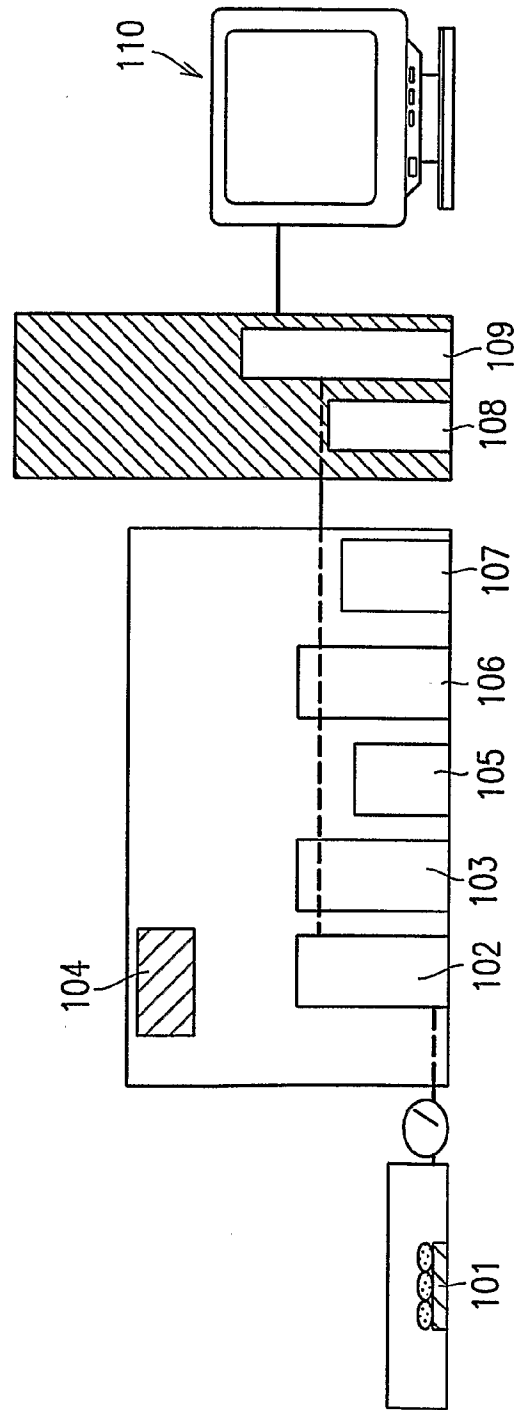
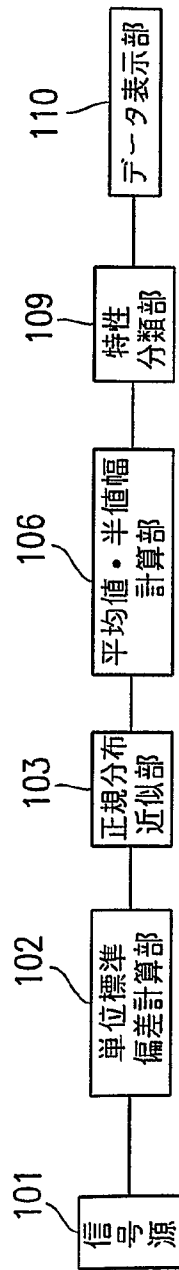


図 6

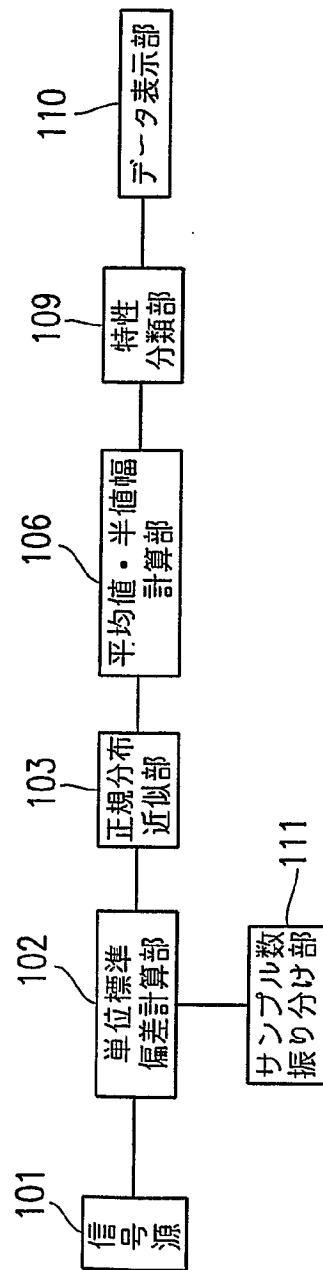
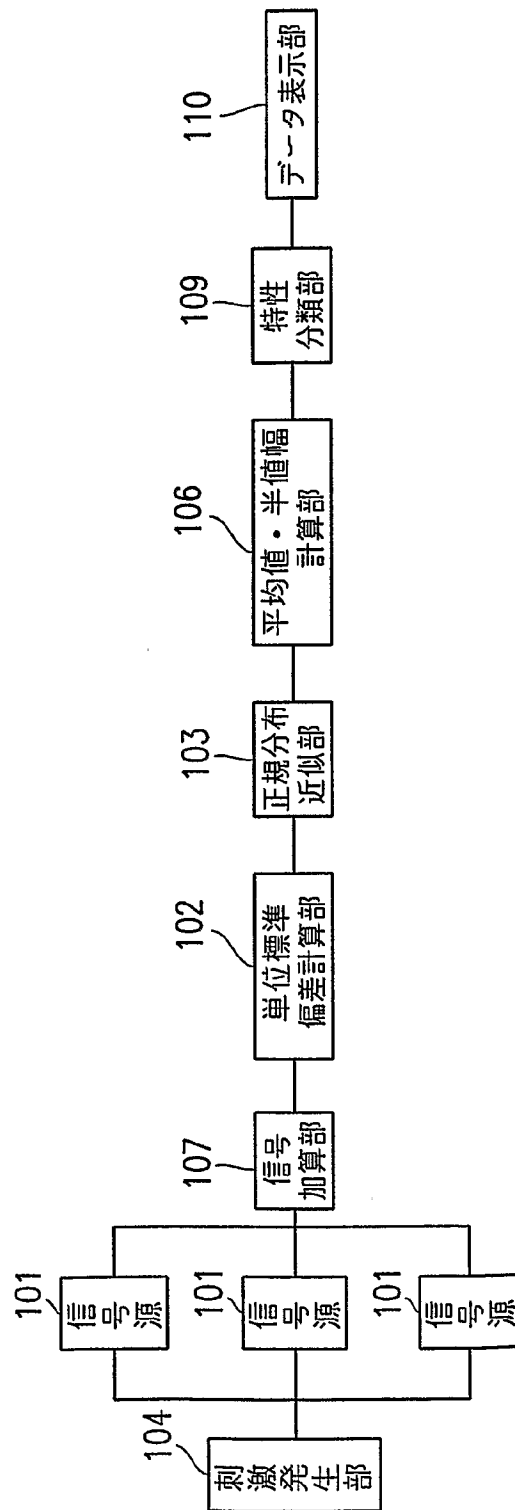


図 7



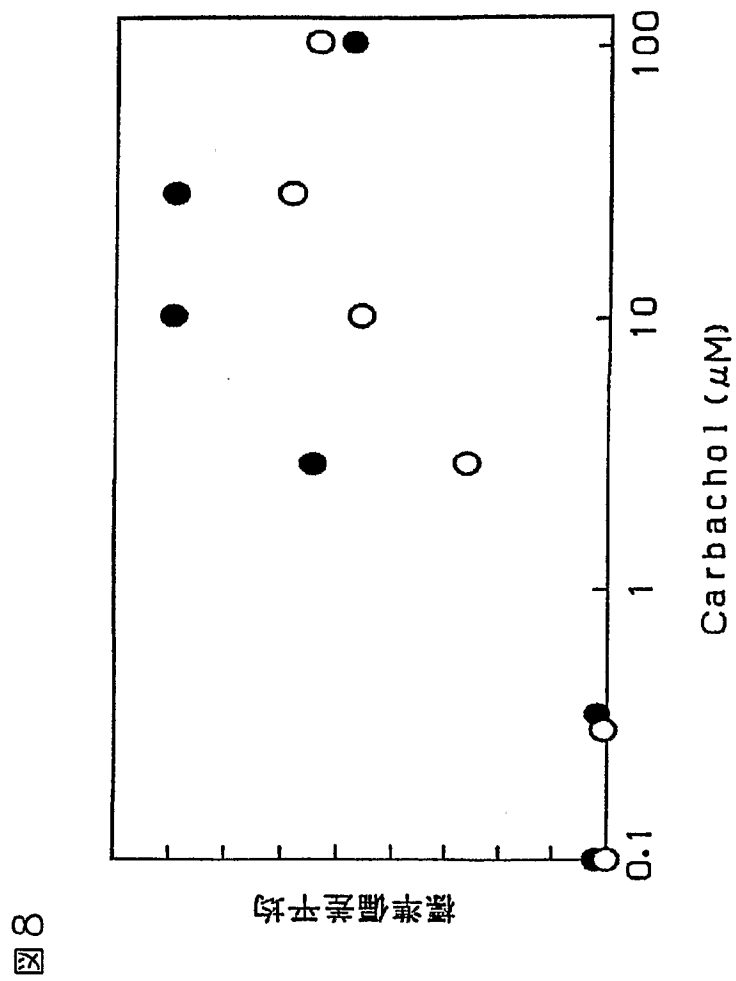
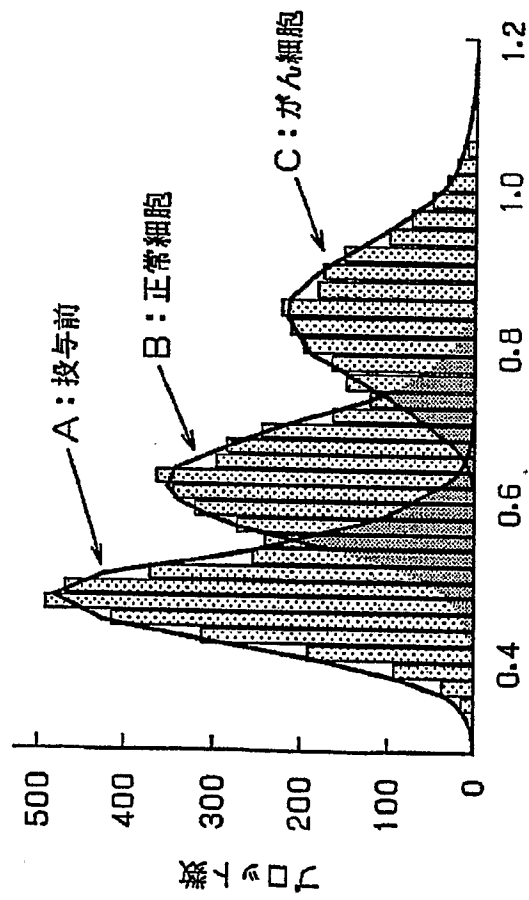


図9





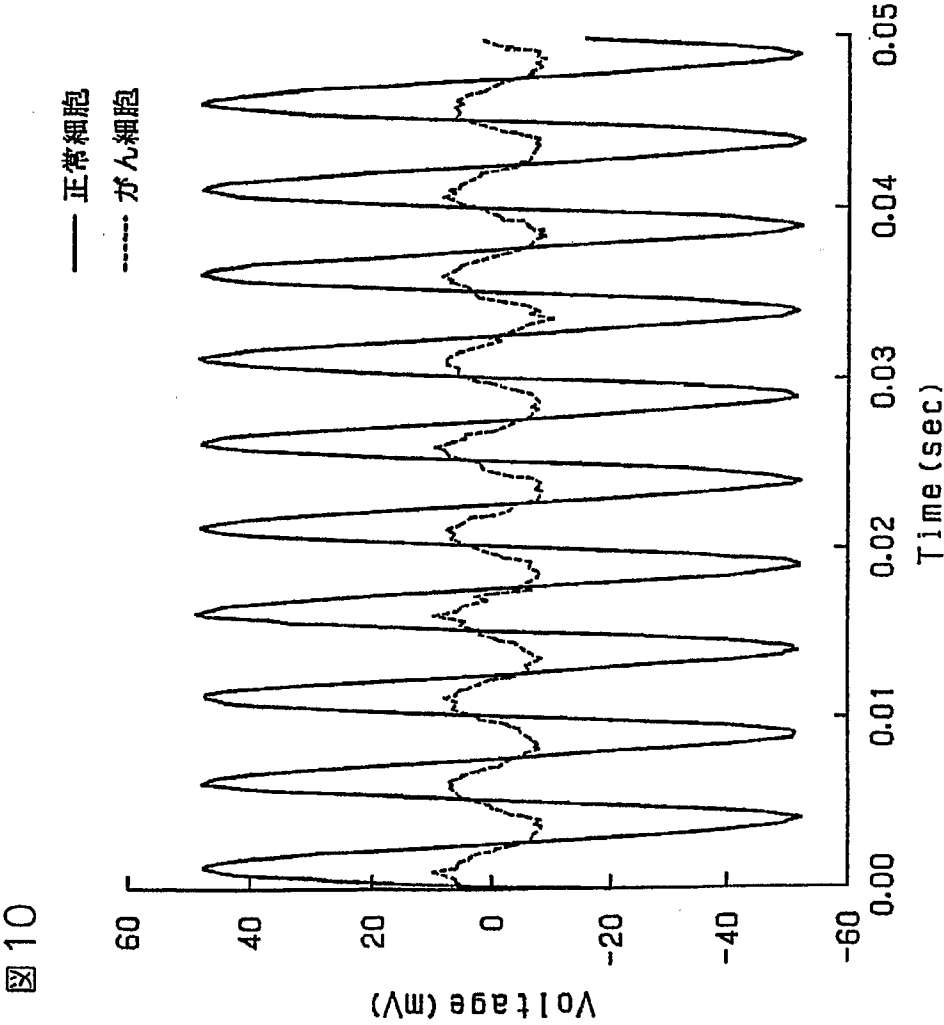


図 11

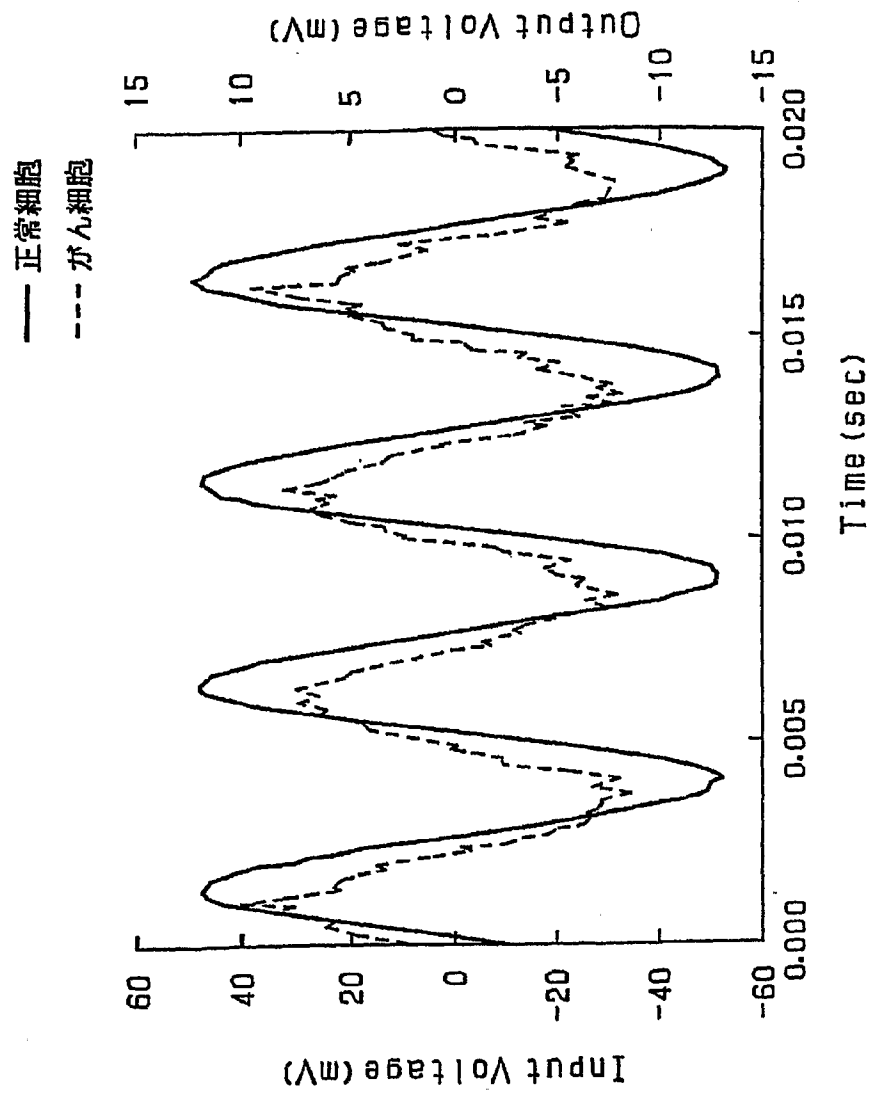
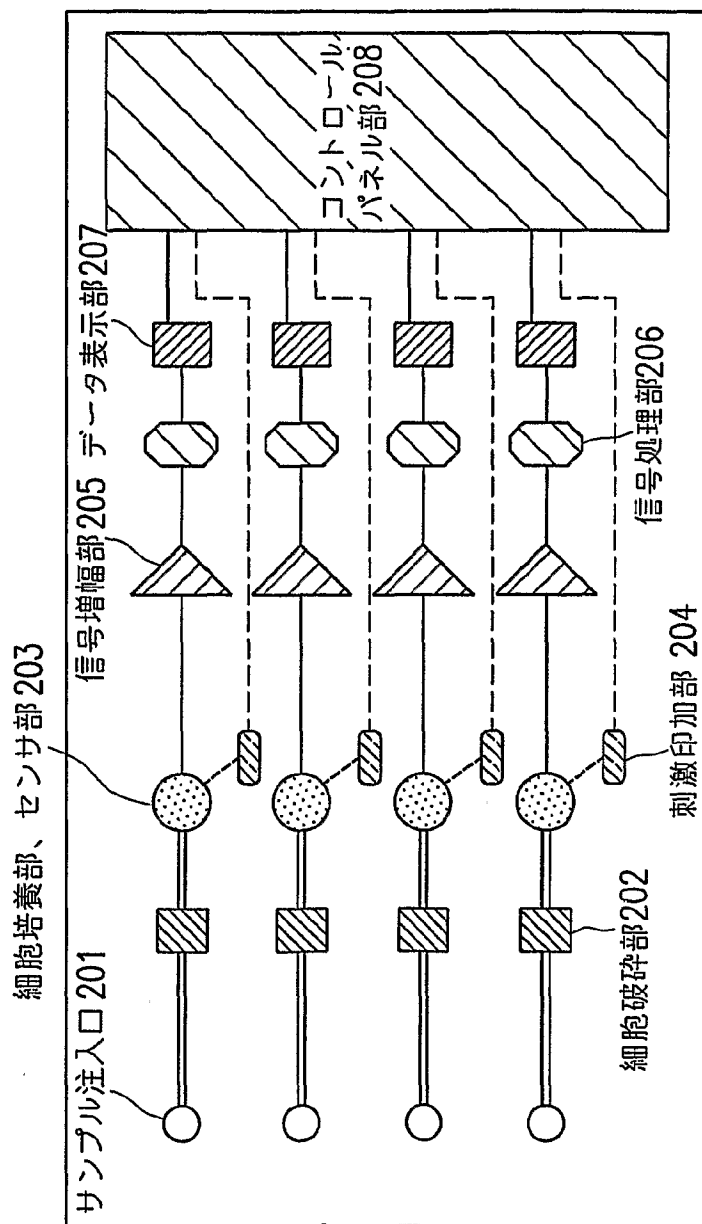


図 12



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07984

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/02, G01N33/483, G01N33/48, G01N27/00, G01N27/26,  
G01N27/30, C12M1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/00-1/20, C12M1/34, G01N27/00-27/30, G01N33/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                        | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X/Y       | DE 19827957 A1 (Micronas Intermetall GmbH),<br>09 December, 1999 (09.12.99),<br>& JP 11-346794 A          | 1-9/10-24             |
| Y         | JP 7-198714 A (Asahi Breweries, Ltd.),<br>01 August, 1995 (01.08.95),<br>(Family: none)                   | 10-18                 |
| Y         | JP 7-203989 A (Hamamatsu Photonics Kabushiki<br>Kaisha),<br>08 August, 1995 (08.08.95),<br>(Family: none) | 10-18                 |
| Y         | WO 00/05574 A1 (Symbiosis GmbH),<br>03 February, 2000 (03.02.00),<br>& JP 2002-522028 A                   | 1,9-24                |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

|   |  |
|---|--|
| * Special categories of cited documents:  | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone   |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date  | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family  |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  |  |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  |  |

Date of the actual completion of the international search  
15 October, 2002 (15.10.02)

Date of mailing of the international search report  
05 November, 2002 (05.11.02)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/07984

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A         | JP 7-184686 A (NEC Corp.),<br>25 July, 1995 (25.07.95),<br>(Family: none)          | 1-24                  |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12Q1/02, G01N33/483, G01N33/48, G01N27/00,  
G01N27/26, G01N27/30, C12M1/34

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12Q1/00~1/20, C12M1/34, G01N27/00~27/30,  
G01N33/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示   | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X/Y             | DE 19827957 A1 (MICRONAS INTERMETALL GMBH) 1999.12.09 &<br>JP 11-346794 A | 1-9/10-24        |
| Y               | JP 7-198714 A (アサヒビール株式会社) 1995.08.01<br>(ファミリーなし)                        | 10-18            |
| Y               | JP 7-203989 A (浜松ホトニクス株式会社) 1995.08.08<br>(ファミリーなし)                       | 10-18            |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.10.02

国際調査報告の発送日

05.11.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4N

8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                  |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| Y                     | WO 00/05574 A1 (SYMBIOSIS GMBH) 2000. 02. 03<br>& JP 2002-522028 A | 1, 9-24          |
| A                     | JP 7-184686 A (日本電気株式会社) 1995. 07. 25<br>(ファミリーなし)                 | 1 - 2 4          |